昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2012, 55(6): 641 -650 ISSN 0454-6296

绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 *AlSP4* 的克隆及取食不同寄主植物后的表达谱分析

孙 洋[1,2], 柏立新[1,*], 张永军[2], 肖留斌[1], 谭永安[1], 吴国强[1]
(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014;
2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 胰蛋白酶类和胰凝乳蛋白酶类丝氨酸蛋白酶是盲蝽科昆虫消化系统内重要的消化酶。为了更好地了解丝氨酸类蛋白酶在绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 消化系统中的作用, 本研究首次克隆了绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 *AlSP4* (GenBank 登录号为 JQ609682)。序列分析结果表明, 该基因开放阅读框长 999 bp, 编码 332 个氨基酸, 预测分子量为 36.84 kDa, 理论等电点为 5.35, N 末端疏水区包含有 16 个氨基酸组成的信号肽。蛋白特征分析表明, 该基因翻译后的蛋白质具有丝氨酸蛋白酶的典型特征, 即氨基酸序列中具有组氨酸(His)、天门冬氨酸(Asp)以及丝氨酸(Ser)残基组成的酶活性催化中心三元件; 该基因翻译后还具有明显的胰蛋白酶前体的特征, 即此基因具有信号肽、激活肽以及胰蛋白酶 N 末端保守的起始氨基酸序列(IVGG)。利用荧光定量 PCR 技术对绿盲蝽雌、雄成虫取食不同寄主植物后 *AlSP4* 的表达谱进行分析, 结果表明: 相对于其他寄主植物, 雌成虫取食 Bt 棉后 *AlSP4* 的表达量最高, 并显著高于取食常规棉后的表达量($P<0.01$)。雄成虫取食茼蒿后 *AlSP4* 的表达量最高; 雄成虫取食 Bt 棉后, *AlSP4* 的表达水平仅次于取食茼蒿后的表达量, 也显著高于取食常规棉后的表达量($P<0.01$)。由此可见, *AlSP4* 是绿盲蝽取食 Bt 棉后的重要消化酶基因, 对绿盲蝽适应 Bt 棉取食具有重要作用。

关键词: 绿盲蝽; 丝氨酸蛋白酶; 胰蛋白酶; 表达谱分析; 寄主植物
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2012)06-0641-10

Cloning of serine protease gene *AlSP4* and its expression patterns after feeding on different host plants in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

SUN Yang[1,2], BAI Li-Xin[1,*], ZHANG Yong-Jun[2], XIAO Liu-Bin[1], TAN Yong-An[1], WU Guo-Qiang[1]
(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Some serine proteases, such as trypsin and chymotrypsin, are important digestive enzymes in the digestive system of mirid bugs. In order to better understand the role of serine proteases in the digestive system of the green plant bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür), we cloned the cDNA encoding serine protease of *A. lucorum* for the first time in the laboratory, which was named as *AlSP4* (GenBank accession no. JQ609682). The results of sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) of *AlSP4* is 999 bp in length, encoding a 332-amino-acid peptide, with the predicted molecular weight (MW) of 36.84 kDa and the theoretical isoelectric point (pI) of 5.35, and the predicted N-terminal hydrophobic region containing 16 amino acid residues displays the typical feature of a signal peptide. Protein signature analysis revealed that the protein encoded by *AlSP4* shares typical structural features of serine proteases with other insects, including His, Asp, and Ser residues for the catalytic amino acid triad of active sites of serine proteases. Putative trypsin precursors from the encoded protein of *AlSP4* cDNA contain a signal peptide, activation peptide, and conserved N-termini (IVGG). By the Real-time

---

基金项目: 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金(SKL2012OP03); 国家科技支撑计划项目(2012BAD19B05); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-18-16); 财政部公益性行业专项(201103012)

作者简介: 孙洋, 男, 1982 年 5 月生, 辽宁省凤城人, 博士, 助理研究员, 研究方向为昆虫毒理、生理与分子生物学, Tel.: 025-84390392; E-mail: symm411@hotmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 025-84390392; E-mail: jaasblx@jaas.ac.cn

收稿日期 Received: 2012-02-28; 接受日期 Accepted: 2012-05-09

PCR technique, we determined the expression pattern of *AlSP4* in *A. lucorum* fed on different hosts. The expression level of *AlSP4* was the highest in female adult *A. lucorum* fed on Bt cottons, significantly higher than that fed on conventional cotton ($P < 0.01$). The expression of *AlSP4* increased significantly in male adult *A. lucorum* fed on Bt cottons, its expression level was only lower than that fed on garland chrysanthemum and significantly higher than that fed on conventional cottons ($P < 0.01$). Therefore, *AlSP4* is the important digestive enzyme gene for adult *A. lucorum* to feed on Bt cottons, and plays an important role in adaption of *A. lucorum* to survive on Bt cottons.

Key words: *Apolygus lucorum*; serine protease; trypsin; expression pattern analysis; host plant

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 属半翅目，盲蝽科，具有寄主广泛、食性杂、繁殖速度快、行动敏捷及天敌控制作用弱等特点，造成其防治困难。从 1997 年开始，我国允许商业化种植转基因(Bt)棉花，有效控制了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)等棉田主要鳞翅目害虫的危害。随着 Bt 棉的大量种植，棉田害虫的生态位也发生了一系列演替，长期作为次要害虫的绿盲蝽等刺吸害虫种群数量剧增，危害增强，并呈严重灾变趋势(Wu *et al*., 2002, 2008; Lu *et al*., 2010a, 2010b)。目前绿盲蝽的防治主要依赖化学农药，但仅依赖化学防治势必会造成绿盲蝽抗药性的产生(Lu *et al*., 2010a; 李静等, 2011)，因此，寻求防治绿盲蝽等盲蝽科植食性害虫的新方法显得尤为迫切。绿盲蝽寄主众多，食性杂，而不同寄主植物包含的营养物质具有很大差别，昆虫体内消化酶活性强弱与摄入营养物质的类型和含量有关，可能反映昆虫对寄主植物营养物质消化吸收的能力，进而影响昆虫本身的生长速度(唐庆峰等, 2005)，因此研究绿盲蝽消化酶基因及取食不同寄主后的表达量对于绿盲蝽的综合防治具有重要意义。

消化酶是昆虫消化食物获取营养物质所必需的，可分为蛋白酶类、淀粉酶类、海藻糖酶类和转化酶类等(钦俊德, 1987; 罗都强等, 2001; Franco *et al*., 2002)。其中，蛋白酶类不仅可以分解植物细胞壁以帮助刺吸式昆虫口针的穿刺，还可以协助其对食物进行部分的口外消化(Cohen, 1998, Agusti and Cohen, 2000)。丝氨酸蛋白酶类是昆虫体内消化系统重要的蛋白酶，种类主要包括胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶以及弹性蛋白酶等，是大多数昆虫消化道内的重要消化酶，大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目以及某些鞘翅目昆虫肠道内的蛋白酶主要是丝氨酸蛋白酶(Ryan, 1990; Wolfson and Murdock, 1990)，在某些半翅目盲蝽科的植食性昆虫的消化系统内，丝氨酸蛋白酶也是重要的消化酶(Colebatch *et al*., 2002)。

目前，就盲蝽类害虫蛋白酶已经有了一些研究，包括：在长毛草盲蝽 *Lygus rugulipennis* 和 *Creontiades dilutus* 盲蝽等盲蝽科昆虫唾液中，蛋白酶的活性早已在消化酶中检测出来(Laurema *et al*., 1985; Colebatch *et al*., 2001)，并且这些盲蝽唾液蛋白酶中富含丝氨酸蛋白酶(Goodchild, 1952; Hori, 1970; Cohen, 1993)。Zhu 等(2003)分别在美国牧草盲蝽 *L. lineolaris* 的肠道内和唾液腺内克隆出了 1 种和 3 种类胰蛋白酶(trypsin-like)基因，并发现唾液腺及肠道内的类胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶是美国牧草盲蝽消化吸收蛋白质类营养物质过程中主要的消化酶。美国牧草盲蝽取食吸收蛋白质类营养物质主要是依靠其唾液腺内的胰蛋白酶，随后才被肠道内的蛋白酶进一步消化，其中唾液腺内丝氨酸蛋白酶的活性占总蛋白酶活性的 80%。与美国牧草盲蝽相似，豆荚盲蝽 *L. hesperus* 唾液腺内总蛋白酶活性也主要以类胰蛋白酶活性为主(Agusti and Cohen, 2000; Zeng *et al*., 2002a, 2002b; Colebatch *et al*., 2002)。而在 *C. dilutus* 盲蝽的唾液腺内，类胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin-like)也发挥着重要作用(Colebatch *et al*., 2001)。丝氨酸蛋白酶不仅存在于半翅目昆虫的唾液腺内，在多种半翅目昆虫肠道内也均被检测出，说明该蛋白酶也是半翅目昆虫肠道内的重要消化酶(Goodchild, 1952; Takanona and Hori, 1974; Terra *et al*., 1988; Cohen, 1993; Colebatch *et al*., 2002; Zhu *et al*., 2003)。

虽然在一些半翅目盲蝽科植食性昆虫种类，如 *C. dilutus* 盲蝽、豆荚盲蝽以及美国牧草盲蝽中，针对丝氨酸蛋白酶类消化酶已经进行了昆虫生理、生化以及分子生物学方面的研究，但是目前针对绿盲蝽相关的报道较少。为了深入研究绿盲蝽取食不同寄主植物后的分子消化机制，本研究首次在绿盲蝽体内克隆了一个丝氨酸蛋白酶基因，并利用荧光定量 PCR 技术研究了绿盲蝽雌、雄成虫取食不同寄主植物后该基因的表达谱，以期为深入研究丝氨酸蛋白酶等消化酶基因在绿盲蝽寄主转换过程中的分

子消化机制奠定研究基础，为绿盲蝽的综合防治提供新思路。

1　材料和方法

1.1　供试虫源

绿盲蝽于 2011 年 4 - 5 月采自江苏大丰及东台蚕豆田，在室内用四季豆 *Phaseolus vulgaris* L. 豆荚继代饲养，成虫期补充 10% 蜂蜜水，饲养条件为温度 25 ± 1℃，相对湿度 70% ± 5%，光周期 12L∶12D。

1.2　绿盲蝽 7 种寄主植物的种植及绿盲蝽取食试验

绿盲蝽 7 种寄主植物(绿豆、蚕豆、豇豆、非转 Bt 棉泗棉 3 号、转 Bt 棉国抗 22、玉米以及茼蒿)的种子分别种在育苗盆中放置于光照培养箱中进行育苗，出苗一周后将各种寄主植物的幼苗分别移栽到花盆中(下直径 12 cm × 上直径 16 cm × 高 16 cm)在光照培养箱内培养 4 ~ 6 周，培养条件为温度 26 ± 3℃，相对湿度 50% ± 5%，光周期 14L∶10D。待 7 种寄主植物长至苗期开始进行绿盲蝽取食试验。

每种供试寄主取 4 株苗期植株作为一组置于长方形玻璃罩子中(长 35 cm × 宽 35 cm × 高 55 cm)接种刚羽化的绿盲蝽成虫，每组寄主植物分别接 10 头刚羽化绿盲蝽成虫(雌雄比例为 1∶1)，于光照培养箱中分别取食 5 d(取食条件为温度 26 ± 3℃，相对湿度 50% ± 5%，光周期 14L∶10D)，各种寄主植物上均出现明显的危害状，每种寄主处理重复 5 次；以相同培养条件下饲养在四季豆上的雌雄绿盲蝽成虫为对照。绿盲蝽成虫用 1.5 mL 离心管收集，标记雌雄，液氮迅速冷冻，- 70℃冰箱保存。

1.3　绿盲蝽成虫总 RNA 的分离及 mRNA 的纯化

总 RNA 的提取以绿盲蝽刚羽化成虫为材料，4 头为一组，共 12 组。每 4 头绿盲蝽成虫活体放入研钵后，液氮研磨，TRIzol 法(Invitrogen，SanDiego)提取总 RNA，选择电泳图谱良好并且 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间的总 RNA 样品合并进行 mRNA 的纯化。绿盲蝽成虫 mRNA 的纯化用 Qiagen mRNA Purification Kit 试剂盒(Qiagen，Valencia，CA)，所有操作均按试剂盒说明书进行，选择电泳图谱良好并且 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间的 mRNA 样品进行绿盲蝽 cDNA 全长文库的构建。

1.4　绿盲蝽成虫 cDNA 全长文库的构建

绿盲蝽成虫组织 cDNA 全长文库的构建利用 In-Fusion SMARTer™ Direction cDNA Library Construction Kit 试剂盒(Clontech，Palo Alto，CA)，以 100 ng 绿盲蝽 mRNA 为起始样品,所有操作均按试剂盒说明书进行。ESTs 批量测序工作由生工生物工程上海测序部完成。测序结果与 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 上已知的昆虫丝氨酸蛋白酶基因的核苷酸序列、氨基酸序列进行比对。

1.5　绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因的引物设计、PCR 扩增与测序分析

绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因全长 cDNA 序列由筛选绿盲蝽整虫 cDNA 文库(由本实验室构建，未发表数据)获得，根据其开放阅读框序列，利用 Primer 5.0 软件设计并合成引物。正向引物：5′-ATGATGAAGTGTTTGTTACTAGTAG-3′；反向引物：5′-TTATTCCGACATTTTGAAAG-3′；引物由生工生物工程上海合成部合成。

以绿盲蝽 cDNA 文库中丝氨酸蛋白酶基因单克隆质粒及绿盲蝽成虫总 RNA 合成的 cDNA 分别为模板，利用高保真 DNA 聚合酶(TaKaRa，Tokyo，Japan)进行 PCR 扩增，扩增完毕后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用 Axygen 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒分别回收 PCR 产物，连接 pGEM-Teasy (Promega) 载体，转化 DH5α 感受态细胞，涂布于含有 Ampicillin /X-gal /IPTG 的 LB 平板上，37℃倒置培养 14 h。经蓝白斑筛选后，分别挑取 4 个阳性克隆于 LB 液态培养基(含 Ampicillin) 培养过夜，Axygen 质粒提取试剂盒提取质粒，PCR 验证。将验证正确的重组质粒送至生工生物工程上海测序部进行测序。利用分子生物学软件 DNAMAN5.22 比对两种模板分别扩增出的丝氨酸蛋白酶基因产物序列的相似性，鉴定基因序列。

1.6　绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因的序列分析与进化树分析

丝氨酸蛋白酶基因核苷酸序列的基本物理性状分析使用(http://web.expasy.org/compute_pi/)上的预测软件。半翅目昆虫已知丝氨酸蛋白酶(serine protease) 氨基酸序列相似性搜索使用 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)工具；氨基酸序列比对软件使用 ClustalX 2.0；利用 MEGA 4.0 软件包中的邻位相连法(Neighbor-Joining)构建进化树。

1.7　绿盲蝽总 RNA 的分离、cDNA 模板的合成及 RNA 酶 H 处理

绿盲蝽取食不同寄主后总 RNA 提取试验，每

个寄主处理为 10 头刚羽化成虫(5 头雄虫、5 头雌虫)，重复 5 次，共计 50 头。每个处理的绿盲蝽单头提取总 RNA，TRIzol 法(Invitrogen，SanDiego)提取。其中每个处理取 4 头雄虫、4 头雌虫合格的总 RNA 样品分别合并进行下面的实验。DNA 酶(DNase Ⅰ，Promega)消化处理后，-70℃保存，以待 cDNA 模板的合成。cDNA 模板的合成应用 MMLV Reverse Transcriptase (Promega)，合成后迅速进行 RNase H(TaKaRa)处理，-20℃保存或直接用于 PCR 反应。

1.8　荧光定量 PCR 引物的合成与扩增效率的检测

本研究所用的 *AlSP*4 引物(退火温度均在 50 ~ 60℃之间)依据 cDNA 文库所得到的基因序列设计，并以绿盲蝽持家基因 *β-actin* 为内标基因(GenBank 登录号为：JN616391)，引物设计运用 Primer 5.0 软件由生工生物工程上海合成部合成，引物序列见表 1。

表 1　荧光定量 PCR 反应的引物序列

Table 1　Oligonucleotide primers designed for Real-time PCR reaction

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequence
*AlSP*4	F：TCGGAGGACATTCTATCA R：GGTTTCTATCGGCACTT
β-actin	F：ACCTGTACGCCAACACCGT R：TGGAGAGAGAGGCGAGGAT

取喂食不同寄主植物后绿盲蝽的 cDNA 模板，测定浓度并稀释成 100，10，1，0.1 和 0.01 ng。分别利用以上 2 对引物进行扩增，每个浓度 5 次重复。利用公式 $E = 10^{-1}/\text{Slope}$ (E 为扩增效率，Slope 为 5 个浓度平均 C_T 值所构成直线的斜率值)计算引物的扩增效率，比较待测丝氨酸蛋白酶基因 *AlSP*4 与内标基因 *β-actin* 扩增效率的数值，确定本研究所用的荧光定量 PCR 引物均达到要求。

1.9　荧光定量 PCR 反应

荧光定量 PCR 试验所用试剂采用 SYBR Premix Ex Taq Kit (TaKaRa，Tokyo，Japan)，仪器为 iCycler iQ(Bio-Rad)，分析软件为 version 3.0a(Bio-Rad)。荧光定量 PCR 反应以 RNase-free 水(TaKaRa，Tokyo，Japan)为阴性对照，起始 cDNA 浓度为 80 ng，每个样品 5 次重复，反应条件为 3 步法，循环数 40 个。

1.10　数据统计与分析

标准样品的荧光定量 PCR 扩增曲线由定量 PCR 仪自动生成，绿盲蝽取食不同寄主植物后相对于四季豆对照的各基因的相对表达量变化以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 (Livak and Schmittgen，2001)。绿盲蝽取食不同寄主植物后，*AlSP*4 相对表达量的差异显著性分析采用统计软件 SAS(SAS v8.0)中的 Duncan 氏新复极差法。

2　结果与分析

2.1　绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因的克隆与序列分析

以绿盲蝽刚羽化的成虫整头虫体 RNA 为模板，构建了全长基因 cDNA 文库，测序结果与 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)上已知昆虫的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列比对得知，本研究获得了 4 种绿盲蝽丝氨酸蛋白酶类基因的全长序列，根据实验室文库编号命名与丝氨酸蛋白酶的缩写字母，分别将这 4 种丝氨酸蛋白酶基因在 GenBank 上注册并命名为 *AlSP*1，*AlSP*2 和 *AlSP*3(另文发表)及 *AlSP*4 (GenBank 登录号为 JQ609682)。为了更好地验证 *AlSP*4 基因序列在虫体内的准确性、完整性，我们重新以绿盲蝽活虫提取的总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR，与 cDNA 文库获得的 *AlSP*4 单克隆质粒模板的扩增产物大小一致(图 1)，测序结果表明两者只有 1 个碱基的差异，核苷酸序列相似性为 99.9%，说明两者同为 *AlSP*4，并鉴定此基因的全长序列。

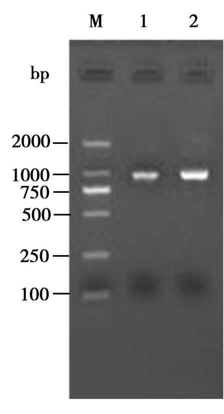


图 1　绿盲蝽 *AlSP*4 的 PCR 扩增

Fig. 1　PCR amplification of *AlSP*4 from *Apolygus lucorum*

M：DL2000；1：以总 RNA 为模板的扩增产物 The amplified product with total RNA as the template；2：以 cDNA 文库为模板的 PCR 扩增产物 The amplified product with cDNA library as the template.

序列分析结果(图 2)表明，*AlSP*4 的开放阅读框含有 999 bp 的核苷酸，编码 332 个氨基酸，预测

分子量为 36.84 kDa，理论等电点预测为 5.35，N 末端疏水区包含 16 个氨基酸组成的信号肽（黑色下划线所示）。如图 2 和 3 所示，与已知盲蝽科昆虫的丝氨酸蛋白酶相似，*AlSP*4 翻译后的氨基酸序列具有明显的丝氨酸蛋白酶的典型特征，即氨基酸序列中具有保守的组氨酸（His）、天门冬氨酸（Asp）以及丝氨酸（Ser）残基组成酶活的催化中心三元件。该基因翻译后还具有明显的胰蛋白酶前体的特征，即此基因具有信号肽、激活肽以及胰蛋白酶 N-末端保守的起始氨基酸序列（IVGG）。

2.2　*AlSP*4 编码蛋白与半翅目昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列比对以及其他昆虫已知丝氨酸蛋白酶系统发育关系分析

将本研究获得的绿盲蝽丝氨酸蛋白酶基因 *AlSP*4 的 cDNA 序列推导出的氨基酸序列（332 个氨基酸），利用氨基酸 blast 比对功能进行同源性搜索。氨基酸 blast 比对结果表明，此基因的氨基酸序列与半翅目盲蝽科昆虫丝氨酸蛋白酶序列一致性最高，一致性在 35%～42% 之间；与其他目昆虫，如鳞翅目、双翅目、膜翅目丝氨酸蛋白酶的相似性较低，一致性在 17%～25% 之间。利用 ClustalX 2.0 软件对搜索的结果与已知全长的盲蝽科昆虫的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列进行相似性分析，*AlSP*4 推导的氨基酸序列与 GenBank 登录号为 AAL15154.1 的 *C. dilutus* 盲蝽丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的相似性最高，达到 42%，而与盲蝽科其他已知全长的半翅目昆虫的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列一致性在 35%～40% 之间（图 3）。

应用 MEGA4.0 软件 Neighbor Joining（NJ）法对包括 AlSP4 在内的 20 种不同种类昆虫的丝氨酸蛋白酶进行系统发育进化树的构建（图 4）。结果显示，半翅目、鳞翅目、双翅目、膜翅目昆虫丝氨酸蛋白酶较为分化，位于不同的分支上。分化的原因可能是这些目昆虫种类繁多、食性不同以及面临不同的自然选择压等，如半翅目昆虫分为植食性、肉食性以及吸血昆虫等，膜翅目昆虫分为肉食性、植食性以及寄生性昆虫等。其中绿盲蝽丝氨酸蛋白酶 AlSP4 和 *C. dilutus* 盲蝽丝氨酸蛋白酶（AAL15154.1）位于一个相邻的分支上，说明绿盲蝽与 *C. dilutus* 盲蝽进化关系较近，可能来源于共同的祖先。

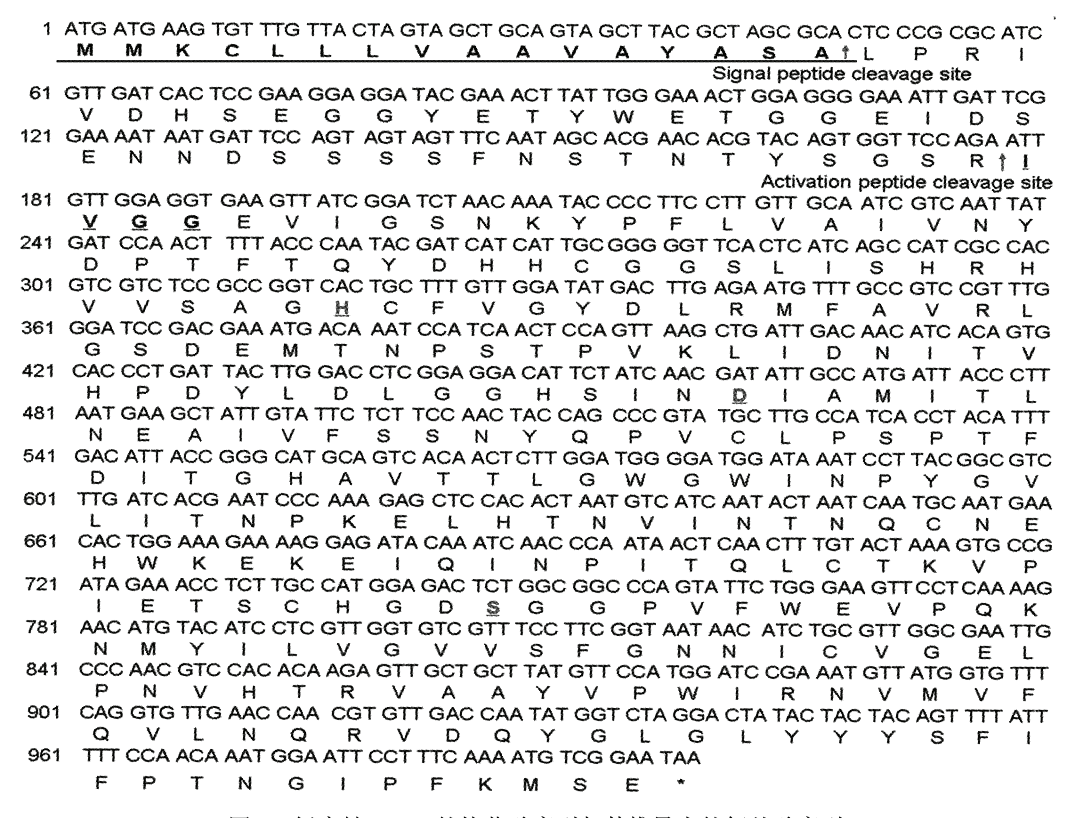


图 2　绿盲蝽 *AlSP*4 的核苷酸序列与其推导出的氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *AlSP*4 of *Apolygus lucorum*

下划线示推导的信号肽；保守的氨基酸用红色字符标记。The predicted signal peptide sequence is underlined, and the onserved amino acids are shown with red letters.

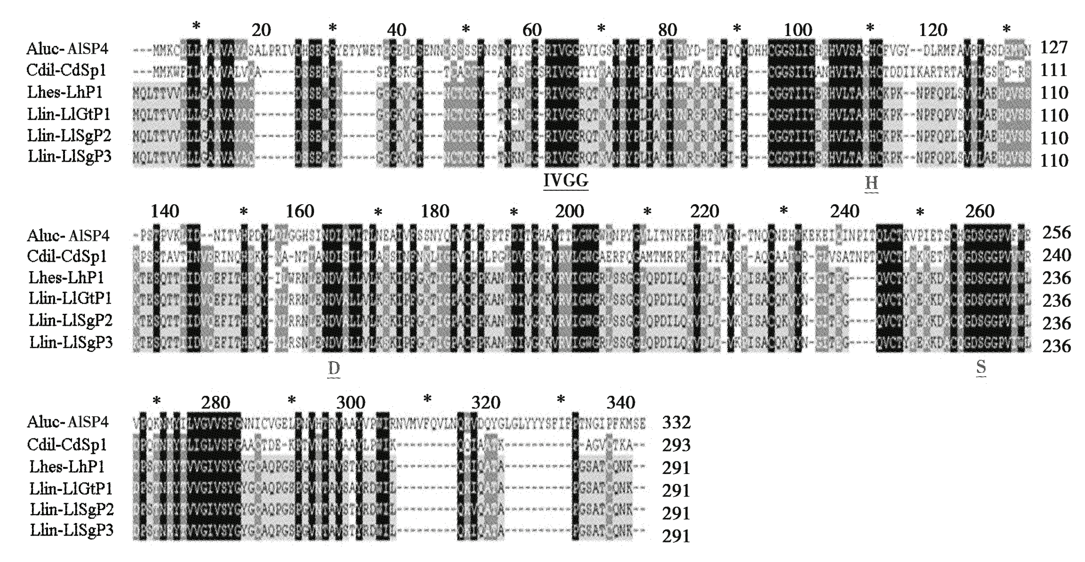


图 3　绿盲蝽 *AlSP*4 推导的氨基酸序列与其他盲蝽科昆虫已知的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的多重联比

Fig. 3　Alignment of the deduced amino acid sequence of *AlSP*4 with homologous proteins from other Miridae species

丝氨酸蛋白酶的来源与 GenBank 登录号如下 The species of the serine proteases originated from and their GenBank accession numbers are: Aluc: 绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (AlSP4: JQ609682); Cdil: 盲蝽 *Creontiades dilutus* (CdSp1: AAL15154.1); Lhes: 豆荚盲蝽 *Lygus hesperus* (LhP1: AAK71135.1); Llin: 美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* (LlGtP1: AAP12676.1; LlSgP2: AAP12673.1; LlSgP3: AAP12674.1).

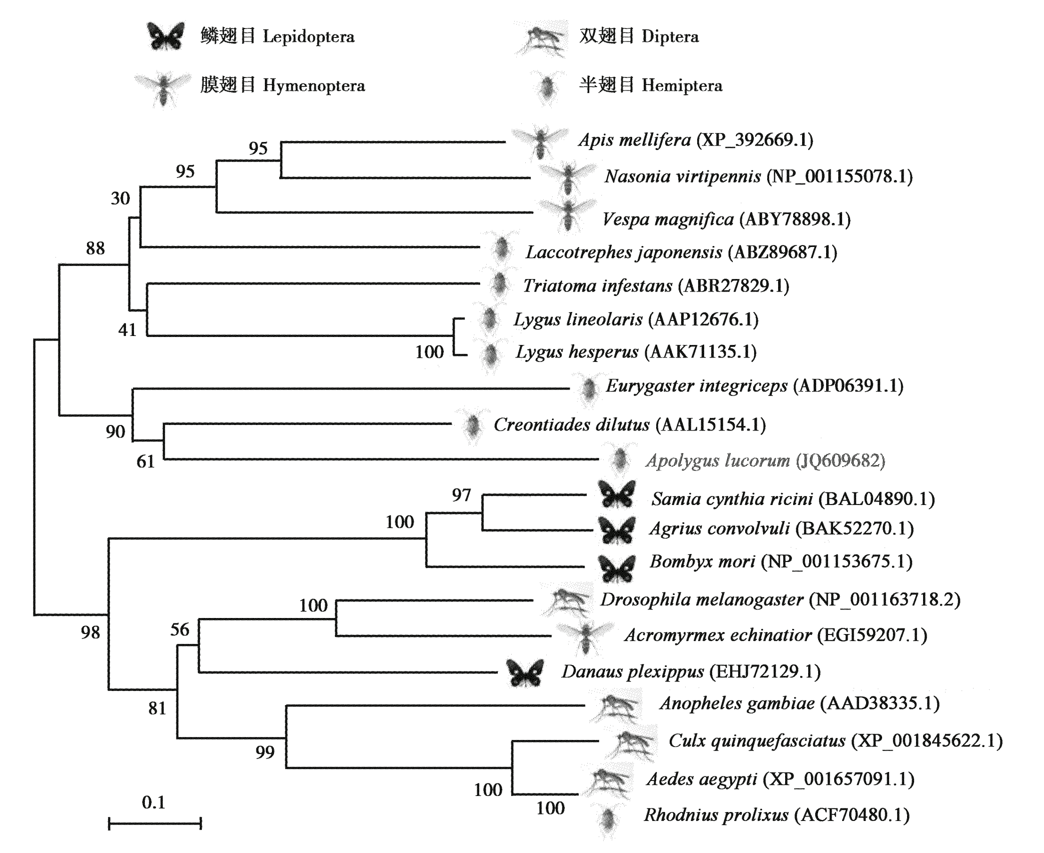


图 4　绿盲蝽丝氨酸蛋白酶 AlSP4 与其他已知昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4　Phylogenetic tree of AlSP4 from *Apolygus lucorum* and serine proteases from other insects based on amino acid sequence

数字代表自展值；图例为遗传距离。Numbers above branches are bootstrap values, and the scale bar represents 0.1% nucleotide substitutions per site.

*lucorum*消化系统中的作用，本研究首次通过筛选绿盲蝽成虫 cDNA 全长文库的方法，分离并克隆了一个全长基因，命名为 *AlSP*4，GenBank 登录号为 JQ609682。序列分析以及与其他盲蝽科昆虫已知的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的多重联比结果表明，*AlSP*4 推得的氨基酸序列具有丝氨酸蛋白酶的典型特征，即氨基酸序列中具有组氨酸(His)、天门冬氨酸(Asp)以及丝氨酸(Ser)残基组成的酶活催化中心三元件，翻译后还具有明显的胰蛋白酶前体特征，即具有信号肽、激活肽以及胰蛋白酶 N-末端保守的起始氨基酸序列(IVGG)。此结果与盲蝽科昆虫已知的以及胰蛋白酶前体基因的蛋白特征相一致(Colebatch *et al*., 2002; Zhu *et al*., 2003)，因此推测此基因是绿盲蝽的一种胰蛋白酶的前体基因。系统进化树的结果表明，绿盲蝽丝氨酸蛋白酶 AlSP4 和 *C. dilutus* 盲蝽丝氨酸蛋白酶(GenBank 登录号：AAL15154.1)亲缘关系最近，说明绿盲蝽与 *C. dilutus* 盲蝽进化关系较近，可能来源于共同的祖先。

与澳大利亚 Bt 棉上重要害虫 *C. dilutus* 盲蝽相似(McColl *et al*., 2011)，绿盲蝽具有寄主广泛、食性杂等特点。然而，绿盲蝽成虫取食 7 种不同寄主植物后，*AlSP*4 表达谱却不相同。绿盲蝽成虫取食 Bt 棉与茼蒿后，相比于取食其他寄主，*AlSP*4 表达量显著升高($P<0.01$)，表明此基因可能是影响绿盲蝽消化 Bt 棉与茼蒿营养物质的重要基因。众多研究表明，不同寄主植物或营养物质对 B 型烟粉虱 *Trialeurodes vaporariorumn* (张桂芬等，2008)、棉蚜 *Aphis gossypii* (张炬红等，2008)、龟纹瓢虫 *Propylea japonica* (张天澍等，2007)、红褐斑腿蝗 *Catantops pinguis* (王世贵等，2008)等消化酶的活性均有不同程度的影响，取食不同的寄主植物，一些半翅目昆虫唾液酶的组分也会发生相应的改变(Zeng and Cohen, 2000)，这就说明取食不同寄主植物后，针对食物源的不同类型，昆虫体内相关的消化酶基因的表达量会进行相应的改变。对于绿盲蝽这种杂食性的昆虫，寄主植物种类众多，其体内应该存在多种蛋白酶参与不同寄主食物的消化过程，而本研究发现的 *AlSP*4 可能是绿盲蝽取食 Bt 棉与茼蒿后，参与消化过程中的一种重要的蛋白酶基因。

自从 Bt 棉在我国大面积商业化种植之后，绿盲蝽已经成为影响我国棉花安全生产的重要致灾因子(Lu *et al*., 2010a, 2010b)，其成虫取食 Bt 棉之后，相比于取食常规棉，*AlSP*4 的表达量显著升高($P<0.01$)。通常情况基因表达量的上升会导致其编码的蛋白的表达量升高，而酶蛋白表达量的升高会使相应酶活性增高(Pan *et al*., 2009; Zhou *et al*., 2010)。有研究表明，Bt 棉上绿盲蝽成虫酶活性在高区间段分布频率明显较高，而在低区间段分布较少，说明绿盲蝽成虫消化吸收 Bt 棉植株内营养的能力可能强于对亲本棉株内营养物质的吸收能力(谭永安等，2011)。所以推测相比取食常规棉，绿盲蝽取食 Bt 棉之后 *AlSP*4 的表达量显著升高($P<0.01$)可能是 Bt 棉上绿盲蝽成虫酶活性在高区间段分布频率较高的原因之一。由此可见，*AlSP*4 是绿盲蝽成虫取食 Bt 棉后的重要消化酶基因，可能对绿盲蝽在 Bt 棉取食过程中的酶活性的强弱与蛋白质的消化具有重要作用。

雌成虫取食同一寄主后，*AlSP*4 的表达量与雄成虫间存在明显差异，说明取食不同寄主植物后，绿盲蝽雌、雄虫体内消化酶基因在分子调控机制上也存在一定的差异。有研究表明，绿盲蝽雌虫对寄主植物挥发物的趋向行为反应比雄虫要灵敏，说明绿盲蝽雌成虫在繁殖后代中担负着为后代寻找合适的生存条件的任务，而雄成虫则不然，是以交配对象作为定位目标(张立娟等，2010)。而本研究表明，绿盲蝽雌、雄成虫不仅在通过气味选择寄主方面存在差异，取食不同寄主植物后在消化机制上也存在差异。这些差异对于雌、雄虫在取食不同寄主食物后的消化能力、生长速度、寿命以及对不同寄主的嗜好程度方面的作用，需要进一步研究。本研究的结果有利于通过昆虫生理学以及分子生物学的手段，在绿盲蝽广泛的寄主中寻找高效的 AlSP4 蛋白酶抑制剂基因，为探寻新的抵抗绿盲蝽消化的蛋白酶抑制剂基因以及转基因抗虫育种奠定研究基础。

参考文献(References)

Agusti N, Cohen AC, 2000. *Lygus hesperus* and *L. lineolaris* (Hemiptera: Miridae), phytophages, zoophages, or omnivores: evidence of feeding adaptations suggested by the salivary and midgut digestive enzymes. *J. Entomol. Sci*., 35: 176 – 186.

Cohen AC, 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. *J. Insect Physiol*., 39: 823 – 829.

Cohen AC, 1998. Solid-to-liquid feeding: the inside(s) story of extra-oral digestion in predaceous Arthropoda. *Am. Entomol*., 44: 103 – 117.

Colebatch G, Cooper P, East P, 2002. cDNA cloning of a salivary chymotrypsin-like protease and the identification of six additional

cDNAs encoding putative digestive proteases from the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 1065 – 1075.

Colebatch GM, East P, Cooper P, 2001. Preliminary characterization of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 415 – 423.

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-de-sa MF, 2002. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases: structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397 – 412.

Goodchild AJP, 1952. A study of the digestive system of the West African cacao capsid bugs (Hemiptera: Miridae). *Proc. Zool. Soc. London*, 122: 543 – 572.

Hori K, 1970. Some variations in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae). *Appl. Entomol. Zool.*, 5: 51 – 61.

Li J, Zhang S, Cui JJ, Luo JY, Lü LM, 2011. Construction and analysis of biological information of cotton SSH library induced by sucking stress of the green plant bugs (*Apolygus lucorum* Meyer-Dür). *Cotton Science*, 23(2): 134 – 139. [李静，张帅，崔金杰，雒珺瑜，吕丽敏，2011. 绿盲蝽刺吸胁迫诱导棉花 SSH 文库的初步构建及生物信息学分析. 棉花学报，23(2): 134 – 139]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Xia B, Li P, Feng HQ, Wyckhuys KAG, Guo YY, 2010a. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328: 1151 – 1154.

Lu YH, Wu KM, Wyckhuys KAG, Guo YY, 2010b. Overwintering hosts of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) in northern China. *Crop Prot.*, 29: 1026 – 1033.

Luo DQ, Qin JC, Zhang X, 2001. Effects of triptolide on the midgut tissue and the digestive enzyme activities of *Mythimna separata* (Walker) larvae. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 29(6): 57 – 60. [罗都强，秦建春，张兴，2001. 雷公藤甲素对粘虫中肠消化酶及其组织结构的影响. 西北农林科技大学学报，29(6): 57 – 60]

McColl SA, Khan M, Umina PA, 2011. Review of the biology and control of *Creontiades dilutus* (Stål) (Hemiptera: Miridae). *Aust. J. Entomol.*, 50: 107 – 117.

Pan Y, Guo HL, Gao XW, 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem. Mol. Biol.*, 152: 266 – 270.

Qin JD, 1987. The Relationships between Insects and Plants: Insect-Plant Interactions and Coevolution. Science Press, Beijing. [钦俊德，1987. 昆虫与植物的关系：论昆虫与植物的相互作用及其演化. 北京：科学出版社]

Ryan CA, 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425 – 449.

Takanona T, Hori K, 1974. Digestive enzymes in the salivary gland and midgut of the bug *Stenotus binotatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47: 521 – 528.

Tan YA, Bai LX, Xiao LB, Sun Y, Zhao HX, Wu GQ, 2011. Effects of introducing *Cry1AC* and *Cry1AC* + *CpTI* genes in cotton on two digestive enzymes activities and trehalose content of *Apolygus lucorum*. *Cotton Science*, 23(5): 394 – 400. [谭永安，柏立新，肖留斌，孙洋，赵洪霞，吴国强，2011. 转 *Cry1AC* 及 *Cry1AC* + *CpTI* 基因对棉花上绿盲蝽 2 种消化酶活性及海藻糖含量的影响. 棉花学报，23(5): 394 – 400]

Tang QF, Wu ZT, Jin T, Wu SL, 2005. The activity of major digestive enzymes in the midgut of *Eupolyphaga sinensis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(5): 557 – 561. [唐庆峰，吴振廷，金涛，吴尚澧，2005. 中华真地鳖中肠主要消化酶的活性研究. 昆虫知识，42(5): 557 – 561]

Terra WR, Ferreira C, Garcia ES, 1988. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.*, 18: 423 – 434.

Wang SG, Zhou Y, Feng LP, 2008. Food consumption, growth and activity of digestive enzymes of *Catantops pinguis* (Stål) fed on different diets under three temperatures. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(1): 1 – 6. [王世贵，周莹，冯利苹，2008. 温度和食物种类对红褐斑腿蝗取食、生长及肠道消化酶活性的影响. 植物保护学报，35(1): 1 – 6]

Wolfson JL, Murdock LL, 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insect. *J. Chem. Ecol.* 16: 1089 – 1102.

Wu KM, Li W, Feng HQ, Guo YY, 2002. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China. *Crop Prot.*, 21: 997 – 1002.

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321: 1676 – 1678.

Zeng F, Cohen AC, 2000. Comparison of α-amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126: 101 – 106.

Zeng F, Zhu YC, Cohen A, 2002a. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 131: 453 – 463.

Zeng F, Zhu YC, Cohen A, 2002b. Molecular cloning and characterization of trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 455 – 464.

Zhang GF, Lei F, Wan FH, Ma J, Yang YG, 2008. Effects of plant species switching on dynamics of amylase and proteinase activity of *Bemisia tabaci* biotype B and *Trialeurodes vaporariorumn*. *Biodiversity Science*, 16(4): 313 – 320. [张桂芬，雷芳，万方浩，马骏，杨玉国，2008. 寄主植物转换对 B 型烟粉虱和温室粉虱淀粉酶及蛋白酶活性的影响. 生物多样性，16(4): 313 – 320]

Zhang JH, Guo JY, Wan FH, Xia JY, 2008. Assessment of transgenic Bt insect-resistant cotton on the digestive enzymes of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphidae). *Acta AgricuIurae Boreali-Sinica*, 23

(Suppl.): 238 - 242. [张炬红, 郭建英, 万方浩, 夏敬源, 2008. 转Bt基因抗虫棉对棉蚜消化酶的风险评价. 华北农学报, 23(增刊): 238 - 242]

Zhang LJ, Cui JZ, Li JQ, Liu CQ, Pan WL, Gao ZL, 2010. Taxis responses of *Lygus lucorum* Meyer-Dur to volatiles of *Ziziphus jujuba* flowering branches with different treatments. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 33: 81 - 84. [张立娟, 崔建州, 李继泉, 刘春琴, 潘文亮, 高占林, 2010. 绿盲蝽对不同处理具花枣枝挥发物的趋性反应. 河北农业大学学报, 33: 81 - 84]

Zhang TS, Li K, Zhang LL, Wang B, 2007. The effect of the artificial diets on the activity of digestive enzymes in *Propylea japonica*. *Journal of Fudan University* (*Natural Science*), 46(69): 941 - 946. [张天澍, 李恺, 张丽莉, 王斌, 2007. 人工饲料对龟纹瓢虫消化酶活性的影响. 复旦学报(自然科学版), 46(69): 941 - 946]

Zhou XJ, Sheng CF, Li M, Wan H, Liu D, Qiu XH, 2010. Expression responses of nine cytochrome P450 genes to xenobiotics in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 97: 209 - 213.

Zhu YC, Zeng FR, Oppert B, 2003. Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 889 - 899.

(责任编辑: 赵利辉)